

Utjecaj folijarne primjene kalcija i dušika na aromatski profil jabuke

Pranjić, Tanja

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:046676>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

TANJA PRANJIĆ
6193/PT

UTJECAJ FOLIJARNE PRIMJENE KALCIJA I
DUŠIKA NA AROMATSKI PROFIL JABUKE

ZAVRŠNI RAD

Modul: Kemija i tehnologija voća i povrća

Mentor na PBF-u: Prof. dr.sc. Branka Levaj

Mentor na BF-u: Izv.prof.dr.sc. Rajko Vidrih

Zagreb, 2015

Rad je izrađen u Laboratoriju za prehrano na Katedri za tehnologije, prehrano in vino, Oddelek za živilstvo, Biotehniške fakultete Sveučilišta u Ljubljani pod mentorstvom izv. prof. dr. Rajka Vidriha, te mentorstvom prof.dr.sc. Branke Levaj, na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

UTJECAJ FOLIJARNE PRIMJENE KALCIJA I DUŠIKA NA AROMATSKI PROFIL JABUKE

Tanja Pranjić 6193/PT

Sažetak: Jabuke sorte 'Discovery' su tijekom rasta bile tretirane dodatnim količinama kalcija i dušika. Tako tretirane jabuke su ubrane i skladištene na 1°C u normalnoj atmosferi na 3 mjeseca. Uzorci su pripremljeni prije i po završetka skladištenja. Svrha eksperimenta bila je uvidjeti kako kalcijeva i dušikova folijarna primjena, te čuvanje u normalnoj atmosferi utječu na sintezu aromatičnih tvari jabuke. Ukupno je identificirano i kvantificirano 15 hlapljivih spojeva. Folijarna primjena kalcija i dušika negativno je utjecala na sintezu estera, a pozitivno na sintezu alkohola. Skladištenjem uzoraka povećala se koncentracija alkohola, posebno 1-butanola, a koncentracija estera se smanjila u tretiranim jabukama. Nakon skladištenja sintetizirao se novi spoj, metil butanoat.

Ključne riječi: jabuka, aroma, mineralna ishrana, kalcij, dušik

Rad sadrži: 23 stranice, 10 slika, 1 tablicu, 23 literarna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) pohranjen u: Knjižnica
Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor na PBF-u: prof. dr. sc. Branka Levaj

Mentor na BF-u: izv. prof. dr. Rajko Vidrih

Rad predan: rujan, 2015

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department for Food Technology

Laboratory of fruit and vegetable preservation and processing

EFFECT OF CALCIUM AND NITROGEN FOLIAR APPLICATION ON APPLES

AROMA PROFILE

Tanja Pranjić 6193/PT

Abstract: Apple variety 'Discovery' was treated with extra amounts of calcium and nitrogen during growth. Treated apples were harvested and stored at 1°C in normal atmosphere for 3 months. Samples were prepared before and after completion of the storage. The purpose of experiment was to see how calcium and nitrogen foliar application, with storage in normal atmosphere affects the synthesis of apple aromatic compounds. In total there are 15 identified and quantified volatile compounds. Foliar application of calcium and nitrogen had a negative effect on the synthesis of esters, and positive for the synthesis of alcohol. Storage of samples caused decreased concentration of alcohol, especially 1-butanol in treated apples. After storage new compound was synthesized, methyl butanoate.

Keywords: apple, aroma compound, mineral nutrition, calcium, nitrogen

Thesis contains: 23 pages, 10 figures, 1 table, 23 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor at PBF: PhD. Branka Levaj, Full professor

Mentor at BF: PhD. Rajko Vidrih, Associate professor

Thesis delivered: September, 2015

Sadržaj:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. JABUKA	2
2.1.1. KEMIJSKI SASTAV JABUKE	3
2.1.2. SORTA 'DISCOVERY'	4
2.2. MINERALNA PRIHRANA	6
2.2.1. DUŠIK	7
2.2.1.1. UTJECAJ DUŠIKA NA RAST I RAZVITAK PLODA	8
2.2.2. KALCIJ.....	9
2.2.2.1. UTJECAJ KALCIJA NA RAST I RAZVITAK PLODA.....	10
2.3. AROMA	10
2.3.1. KARAKTERISTIČNI AROMATSKI SPOJEVI JABUKE	11
2.3.2. BIOSINTEZA AROMATSKIH SPOJEVA	12
2.3.3. UTJECAJ MINERALNE PRIHRANE NA TVARI AROME	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. MATERIJALI	16
3.2 METODE RADA	16
3.2.1. PRIPREMA UZORAKA	16
3.2.2. ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA HS-SPME/GC-MS METODOM.....	16
4. REZULTATI.....	19
5. RASPRAVA	22
6. ZAKLJUČAK.....	23
7. LITERATURA.....	24

1. UVOD

Jabuka sa svojim bogatim hranjivim sastojcima i niskom energetsom vrijednošću spada u najrasprostranjenije vrste voća. Zbog značajne količine vitamina, minerala, dijetalnih vlakana povoljno djeluju na ljudsko zdravlje, te smanjuju rizik od mnogih bolesti. Svrstava se u skupinu jezgričavog voća. Sjemenke su gorkog okusa, te su stoga nejestive. Plod jabuke je čvrstog i okruglog oblika, a pokožica dolazi u različitim nijansama i bojama, što prvenstveno ovisi o sorti jabuka. Boja može biti crvena, zelena, žuta ili kombinacija ovih boja. Sorte se osim boje, razlikuju i po okusu, slatkoći ili kiselosti i konzistenciji. Za pravilan razvoj ploda i svih njegovih poželjnih karakteristika, biljci su potrebni određeni nutrijenti u određeno vrijeme u dovoljnoj količini. Obzirom da ponekad u tlu nema dovoljno mineralnih tvari neophodnih za pravilan razvoj ploda, oni se mogu dodati. Kalcij i dušik su važni radi poboljšanja kvalitete voća i sprječavanju fizioloških poremećaja, a mogu se dodati folijarnom primjenom. Sve to može imati utjecaj između ostalog i na aromu ploda.

Aroma je jedna od najvažnijih karakteristika jabuka, te obično ima odlučujuću ulogu kod potrošača u određivanju kvalitete i poželjnosti ploda stoga je potrebno tijekom rasta ploda poduzeti odgovarajuće mjere kako bi došlo do razvoja karakteristične arome. Nadalje, identifikacija pojedinih aromatskih spojeva je vrlo važna, kako bi se odredili spojevi karakteristični za okus pojedine sorte jabuke. Identifikacija spojeva se najčešće provodi upotrebom plinske kromatografije i masene spektrometrije.

Cilj rada je bio istražiti kako folijarna primjena kalcija i dušika, te skladištenje utječe na aromatski sastav jabuke sorte 'Discovery'.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JABUKA

Rod jabuke, *Malus*, pripada potporodici *Pomoideae* porodice *Rosaceae*. Postoji više od 30 osnovnih vrsta jabuke i većina se može lako hibridizirati (Korban 1986, Way i sur.,1991). Njezin primarni divlji predak je *Malus Sieversii* (slika 1) koji je smješten na granici zapadne Kine i bivšeg Sovjetskog Saveza. Kultivaciju jabuka su prakticirali stari Grci i Rimljani, te kao rezultat njihovih putovanja i osvajanja, proširile su se Europom i Azijom.



Slika 1. *Malus Sieversii* (Anonymous 1.)

Danas se jabuke uzgajaju diljem svijeta. Izuzetno su prilagodljivo voće. Dobro se prilagođavaju različitim temperaturnim područjima, od ekstremno hladnih kao što su Sibir i Južna Kina do puno toplijih područja poput Kolumbije i Indonezije. Mogu se konzumirati svježe odmah nakon berbe ili nakon skladištenja čak i do godine dana, ako se skladište u kontroliranoj atmosferi. Mogu se prerađivati u sok, pire, kompot, želirane proizvode, može se sušiti te koristiti u pitama, tortama i kolačima. Sok se može konzumirati svjež, a može se dalje prerađivati alkoholnom fermentacijom u vino i dalje octenom fermentacijom u ocat.

Prema zadnjim podacima iz 2012. godine najveći proizvođač jabuka na svijetu je Kina sa 37 000 000 tona godišnje, zatim slijede Sjedinjene Američke Države sa 4 000 000 tona. Najveći proizvođači u Europi su Turska i Poljska sa približnom proizvodnjom od 3 000 000 tona godišnje. U 2013. godini u Europi najviše su se proizvodile jabuke sorte 'Golden Delicious', zatim 'Gala', 'Idared', 'Red Delicious', 'Jonagold'. (WAPA, 2015).

Hrvatska je u 2014. godini imala proizvodnju jabuka od 96 703 tone (DZS, 2015). Prema statističkim podacima iz 2012. godine u Hrvatskoj najzastupljenije sorte jabuka su 'Idared', 'Golden Delicious', 'Golden Spur', 'Jonagold', 'Granny Smith', 'Gala', 'Florina', 'Braeburn'. (DZS, 2015)

2.1.1. KEMIJSKI SASTAV JABUKE

Jabuke su prirodan izvor šećera i prehrambenih vlakana (od kojih su 80% topljivi), različitih minerala i vitamina. Svježe konzumirane jabuke sadrže malo masti i kolesterola i sadrže manje od 100 kalorija .

Postoje razlike unutar kemijskog sastava pojedinih jabuka s obzirom na sortu, zrelost, područje rasta, agronomske i okolišne uvjete. Jabuke sadrže otprilike: 85% vode, 14% ugljikohidrata, 2.4% dijetetska vlakna, 0.3% proteina, 0.20% lipida (tablica 1). Otprilike 75% ugljikohidrata u jabukama su šećeri, fruktoza (otprilike 6%), glukoza (2.4%) i saharoza (2.0%). Šećerni alkohol, sorbitol (0.2%) je također prisutan. Prevladava jabučna kiselina (0.3-1-0%). Sorte, zrelost i okolišni uvjeti tijekom rasta i skladištenja utječu na kiselost jabuka.

Tablica 1. Kemijski sastav svježe jabuke (USDA National Nutrient Database)

Sastojak	Udio u 100 g
voda	85.56 g
proteini	0.26 g
lipidi	0.17 g
pepeo	0.19 g
ukupni ugljikohidrati	13.81 g
saharoza	2.07 g
glukoza	2.43 g

fruktoza	5.90 g
škrob	0.05 g
dijetetska vlakna	2.40 g
kalcij	6.00 mg
željezo	0.12 mg
magnezij	5.0 mg
fosfor	11.0 mg
kalij	107 mg
natrij	1.0 mg
vitamin C	4.60 mg
vitamin A	54.0 IU
kalorije	52.0 Kcal

2.1.2. SORTA 'DISCOVERY'

Discovery (slika 2) je najpoznatija rana sorta jabuka iz Engleske. Za Discovery se često smatra da je vrlo stara sorta, ali nastala je u kasnim 1940-ima u Langhamu, Essex od sjemena Worcester Pearmain. Discovery je dakle sjemenjača Worcester Pearmaina, sorti ranih jabuka iz 19. stoljeća odakle potječe crvena boja jabuka. Dostupna je krajem kolovoza i početkom rujna.



Slika 2. Sorta 'Discovery' (Anonymous 2)

Po okusu se ne ističe previše od kasnih sorti. Okus je više kiselkast nego sladak. Poneke jabuke mogu imati okus po jagodama, iako je ta karakteristika varijabilna. Worcester Pearmain je vjerovatno izvor okusa po jagodama, koji je pronađen još u nekim sortama poput Katy, koja je po izgledu također slična Discovery sorti, ali ima jači okus i dolazi kasnije u sezoni. Jabuke su žuto – zelene boje, obično sa tamno crvenim slojevima koji nastaju od sunčevih zraka. Zanimljiva karakteristika Discovery jabuka je da ponekad crvena boja može procuriti u mezokarp ploda (slika 3).



Slika 3. Crvena boja mezokarpa jabuke (Anonymous 3)

2.2. MINERALNA PRIHRANA

Biljke se uzgajaju na podlogama koje sadrže optimalne količine svih elemenata za rast i razvoj biljke, poput esencijalnih minerala, dušika, fosfora, ugljikohidrata i vitamina (Ramawat i Mathur, 2007).

Mineralna ishrana biljaka je veoma važna zbog odlučujućeg utjecaja kojeg ima na kvalitetu plodova i prinos. Mineralne nutrijente, potrebne za rast i razvoj biljke, dijele se na makronutrijente (dušik, fosfor, kalcij, kalij, sumpor, magnezij) i mikronutrijente (željezo, mangan, cink, bakar, bor, molibden, klor, nikal).

Parameteri unutarnje kvalitete (sadržaj šećera i kiseline) i parametri vanjske kvalitete (boja, oblik, čvrstoća, stadij razvoja ploda) su usko povezani sa makronutrijentima (Marcelle, 1995; Tagliavini i sur., 2000; Neilsen i sur., 2000).

Voće prima nutrijente pomoću ksilema u korijenju i remobilizacijom iz lišća i drvenih dijelova (Tagliavini i sur., 2000). U određenom periodu stablo voćke zahtjeva značajno veću količinu nutrijenata od one dostupne u tlu. Ta opskrba može biti otežana deficitom vode ili viškom vode. Nedostatak specifičnih nutrijenata, zbog slabe apsorpcije iz tla, može se nadomjestiti folijarnom fertilizacijom. Ona podrazumijeva prskanje lišća i stabla hranjivim tvarima, koji se onda apsorbiraju u stanice.

U voćnjacima folijarna primjena kalcija je poprilično važna kada je režim vode nepovoljan, jer utječe na položaj vode u stanici i regulira ravnotežu stanične tekućine, doprinosi izjednačavanju elektrostatskog potencijala vode i omogućuje rast i diobu stanica. Razvoj fizioloških promjena i bolesti tokom skladištenja jabuka, povezano je manjim sadržajem Ca i većim sadržajem N, P, K i Mg u voću (Glenn i Poovaiah, 1985; Raese i Staiff, 1990).

2.2.1. DUŠIK

Dušik je makroelement koji je biljci potreban u najvećoj količini. Ima glavnu ulogu u biljnom metabolizmu kao sastavni dio proteina, nukleinskih kiselina, klorofila, koenzima, fitohormona i sekundarnih metabolita.

Dušik u tlu postoji u obliku amonijeva iona NH_4^+ i nitratnog iona NO_3^- . Nakon uzimanja amonijaka ili nitrata iz tla, dušik se asimilira u aminokiseline u korijenu ili izdanku biljke (Marschner, 2012). Najviše nitrita se reducira u aminokiseline u listu biljke. Nastale aminokiseline zatim se mogu vratiti u korijen ili druge organe biljke preko floema (slika 4). Dostupnost dušikovih izvora u tlu ovisi o svojstvima tla kao što su tekstura, pH, vlaga i mikrobiološka aktivnost (Robinson, 1994).



Slika 4. Prikaz unosa dušika i redukcije, te nastajanja proteina u biljkama

Kako bi djelovanje dušika bilo što djelotvornije, tlo treba sadržavati i druge elemente u određenoj koncentraciji, kao što su fosfor, kalij, kalcij, magnezij. Ukoliko ovi elementi nisu u skladnom omjeru dolazi do raznih poremećaja u ishrani. Smatra se da tla koja sadrže 0.05-0.08% dušika nisu zadovoljavajuća, dok tla koja sadrže 0.2 % dušika su zadovoljavajuća (Šoškić, 2008).

2.2.1.1. UTJECAJ DUŠIKA NA RAST I RAZVITAK PLODA

Nedostatak dušika u tlu odražava se nepovoljno na cjelokupno stanje voćke, na njen vegetativni i reprodukcijski razvitak. Najuočljiviji simptomi nedostatka dušika su usporeni rast mladice, koja je tanka i slabo razvijena, zatim sitno i blijedo zeleni listovi, nedovoljno zametanje plodova, tvrdi plodovi, slatki i jače obojeni. U početnoj fazi razvoja ploda otpadaju kad dostignu veličinu lješnjaka (kod jabuke i kruške). Zbog nedostatka dušika može se pojaviti prijevremeno otpadanje lišća i smanjenje površine lista. Kada kod voćke prevladavaju kratke grane sa mnoštvo rodni pupoljaka, znači da tlo oskudjeva u dušiku i kaliju. Ako u tlu ima puno dušika, njegov utjecaj na voćku je višestruko nepovoljan. Voćke su previše bujne, lišće je modrozeleno, plodovi oskudjevaju u šećeru, povećava se osjetljivost prema raznim bolestima i štetočinama itd. Produžuje se sazrijevanje plodova i smanjuje im se trajnost (Šošković, 2008).

Dušik u voću negativno utječe na čvrstoću, postotak suhe tvari, refraktometrijski indeks, sadržaj topljivih šećera i kiseline (Marcelle, 1995). Suvišak dušika uzrokuje loš razvoj boje pokožice (Tagliavini i sur., 2000).

Iako prekomjerna gnojidba vodi do povećanje mase ploda (Hansen, 1980; El-Gazzar, 2000; Gosh et al., 2004), optimalna opskrba dušikom je od velike važnosti kako bi se izbjegli negativni efekti poput loše kvalitete voća (Marsh i sur., 1996) i sposobnost skladištenja (Tahir i sur., 2007) i spriječili utjecaj na okoliš kao što je zagađenje podzemnih voda (Sanchez i sur., 2003).

Jabuka pruža izvrstan primjer kako boja reagira na različitu razinu dušikove ishrane. Velik broj eksperimentalnih dokaza ukazuje da razvoj crvene i žute boje pokožice ukazuje koliko je jak odnos razine dušika u drvetu u vrijeme zrenja. Razina dušika u stablu jabuke najviše utječe na razvoj boje ploda u periodu dva ili tri mjeseca prije branja.

2.2.2. KALCIJ

Kalcij ima mnogobrojne uloge u tlu, biljkama i mikroflori. Kalcij utječe na kemijska i fiziološka svojstva tla, održava strukturu i funkciju stanične membrane, i direktno je uključena kao sekundarni glasnik u stanici (Lal, 2006).

Kalcij se u tlu pojavljuje u obliku kalcita (CaCO_3) ili dolomita [$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$] (Mengel, 2001). Smatra se da tlo koje sadrži 9 mg kalcija na 100 g zemlje nije dovoljno opskrbljeno; ako ga ima od 9-18 mg onda je srednje opskrbljeno, a preko 15 mg je potpuno osigurano (Šoškić, 2008).

Nedostatak kalcija u tlu je rijedak u prirodi, ali se može pojaviti na tlima s visokom kiselosti i niskom zasićenosti. Manjak kalcija u biljkama je posljedica i lošeg kretanja kalcija u dijelove biljke iznad tla, poput ploda ili sjemenki i zahvaljujući magneziju i aluminiju, koji mogu potiskivati unos kalcija u biljku (Lal, 2006).

Tretmani kalcijem predstavljaju sigurnu i učinkovitu metodu za povećanje kvalitete i trajnosti za mnoge vrste voća, jer smanjuju kvarenje, mekšanje ploda i proizvodnju etilena nakon branja. Kalcij se može primjeniti kao tretman prije branja u sustavu za navodnjavanje ili prskanjem stabla, otopinama kalcija, iako je najučinkovitije kada se kalcij primjenjuje direktno na površinu ploda (Kadir, 2004). Kalcij se može primjeniti i kao tretman poslije branja, uranjanjem plodova u otopinu kalcijevih soli ili vakuumskom infiltracijom.

Velike količine dušikovih i kalijevih folijarnih primjena, nepravilno orezivanje, dugotrajna upotreba herbicida, temperaturni stres također mogu smanjiti koncentraciju kalcija u plodu.

Kalcij je netoksičan mineralni element, čak i u visokim koncentracijama, i veoma je učinkovit u detoksikaciji visokih koncentracija drugih mineralnih elemenata u biljci.

2.2.2.1. UTJECAJ KALCIJA NA RAST I RAZVITAK PLODA

Manja koncentracija kalcija u jabuci uzrokuje fiziološke poremećaje poput gorkih pjega, unutarnjih kvarenja, tamne paleži kože (Centkowski i Tomala,2000; Dris i sur.,1998), truljenja ploda zbog djelovanja patogenih mikroorganizama (Biggs i sur.,1993). Jabuke deficitarne kalcijem dozrijevaju ranije i gube na masi tijekom skladištenja.

Kako bi skladištenje jabuka bilo što učinkovitije, važno je proizvoditi jabuke s visokom koncentracijom kalcija. Optimalna količina kalcija je različita za pojedine sorte. Zadovoljavajući omjer je 45-60 mg kalcija/kg svježeg voća (Dris i sur., 1998; Johnson,1980). Kalcij povećava čvrstoću ploda, te utječe na zelenu boju jabuka. Što je jabuka bogatija kalcijem, to će jabuka biti zelenija.

Kalcij može djelovati negativno u većim količinama. Može doći do pojavljivanja žutice, onemogućavanja uzimanja elemenata poput magnezija, kalija, željeza, mangana, bora čiji nedostatak gore utječe na voćke, nego nedostatak kalcija (Šoškić, 2008).

2.3. AROMA

Aroma voća je kompleksna smjesa velikog broja spojeva koji doprinose ukupnoj senzorskoj kakvoći ploda specifične vrte i sorte (Sanz i sur., 1997). Kemijski gledano, aromu voća čine hlapljivi spojevi odgovorni za miris, i nehlapljivi spojevi odgovorni za okusni doživljaj voća (Pozderović, 1984).

Hlapljivi spojevi mogu se klasificirati kao primarni ili sekundarni spojevi. Primarni spojevi su prisutni u netaknutom tkivu voća, dok sekundarni nastaju kao posljedica oštećenja tkiva. Hlapljivi profili voća su kompleksni i ovisni su o sorti, zrelosti, okolišnim uvjetima prije i poslije branja, uzorku voća (u slučaju ako je oštećeno voće, u komadićima ili homogenizirano) i metodama analize.

Količina hlapljivih tvari u hrani je izuzetno niska (otprilike 10-15 mg/kg) (Belitz, Grosch, Schieberle, 2009). Porast hlapljivih spojeva u većini voća je dobar pokazatelj dozrijevanja ploda, a karakteristična aroma se razvije tek po završetku faze zrenja.

U voću, spojevi arome se nalaze u vakuolama smještenim na određenim mjestima unutar ploda. Tako se kod jabuka i krušaka aromatični sastojci nalaze u pokožici, dok kod citrusa u kori. Nosači aromatskih sastojaka su razni lipidi, voskovi i pektinske tvari, a metabolizmom stvoren etanol i voda su dobri otapajućii spojevi za aromatične sastojke. Spojevi arome se najčešće oslobađaju tijekom narušavanja stanice.

2.3.1. KARAKTERISTIČNI AROMATSKI SPOJEVI JABUKE

Aromatski profil jabuke čini preko 350 hlapljivih spojeva, iako se samo njih par ističe u tipičnoj aromi jabuke (Dixon i Hewett, 2000; Fuhrmann i Grosch,2002). Ti spojevi uključuju estere, alkohole, aldehide, ketone i seskviterpene (Song i Fourney, 2008). Kvalitativno i kvantitativno najvažniji hlapljivi spojevi u jabuci su esteri. Doprinosu više od 80 % važnim aromatskim spojevima jabuke (Altisent i sur.,2009).

Sinteza hlapljivih spojeva u jabuci dijeli se prema:

1. vrsti i količini estera i alkohola (Dirinick i Schamp,1989; Paillard, 1990)
2. uzorku proizvodnje arome (Dirinick i Schamp,1989)
3. boji kože (Paillard,1979)
4. C6 aldehydima (Paillard, 1990).

Ester tipovi sorti kategoriziraju se prema tipu estera na: acetat ester tip ('Golden Delicious', 'Calville Blanc'), butanoat ester tip ('Belle de Boskoop', 'Canada Blanc', 'Richard'), propanoat ester tip ('Reinette du Mans', 'Richard', 'Starking') (Paillard,1990). Za žuto obojene sorte utvrđeno je da uglavnom proizvode estere octene kiseline,a crveno obojene sorte uglavnom estere maslačne kiseline (Paillard,1979). Visoke koncentracije heksil acetata i butil acetata karakteriziraju 'Cox's Orange Pippin', 'Elstar', 'Golden Delicious' i 'Jonagold' jabuke.

Alkoholne sorte jabuka 'Granny Smith', 'Nico', 'Paulared' i 'Summerred' karakteriziraju visoke koncentracije etil butanoata i heksan-1-ola. Koncentracije C6 aldehida u 'Cox's Orange Pippin' i 'Jonathan' jabukama je 4-5 puta veća nego od koncentracije heksanala u 'Golden Delicious' jabukama i 100 puta veća od trans-2-heksanala (Paillard,1990). Na tržištu su poželjnije sorte sa naglašenom aromom estera, za razliku od alkoholnih sorti (Ulrich i sur.,2009).

Dunemann i sur. su proveli istraživanje na više od 100 različitih sorti jabuka, kojima su odredili hlapljive profile s plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom. Esteri butil acetat, heksil acetat i 2-metil-butil acetat, najvažniji hlapljivi spojevi zbog velikog aromatskog učinka, su ekstrahirani u velikim količinama u većini sorti jabuka. Pentil acetat je bio manje izražen. Rezultati se slažu s ostalim istraživanjima, u kojima je također istaknuta važnost ova tri estera. Schaffer i sur. (2007) su izmjerili visoke koncentracije istih estera poslije izlaganja 'Royal Gala' jabuka etilenu, pri čemu su butil acetat i heksil acetat bili glavni spojevi.

Hlapljivi spojevi imaju različit doprinos organoleptičkim karakteristikama jabuka. U 'Golden Delicious' jabukama prisutnost butanola i heksanola je povezana s okusom slatkoće, acetaldehid i trans-2-heksanal sa bockavom kiselošću, etil butirat i etil 2-metilbutirat s voćnim okusom i heksil acetat sa slatkim-voćnim mirisom. Ostali spojevi poput propila, butila, pentil acetata ili butil butirata ne pridonose nijednom specifičnom karakteru, ali njihovo odsustvo negativno utječe na aromu (Visai, 1993).

Hlapljive komponente koje bi mogle uzrokovat neugodnu aromu u jabukama su: acetaldehid (pikantnost), trans-2-heksanal i butil propionat (gorak okus) , 3-metilbutil butirat i butil 3-metilbutirat (pokvareni okus).

2.3.2. BIOSINTEZA AROMATSKIH SPOJEVA

Tvari arome voća i povrća sintetiziraju se iz osnovnih nutrijenata kao što su ugljikohidrati, posebice monosaharidi i disaharidi; proteina, osobito slobodnih aminokiselina; i lipida, triglicerida ili njihovih derivata; kao i vitamina i minerala (slika 5). Ovi nutrijenti su proizvedeni fotosintetskim i drugim povezanim metaboličkim procesima u biljci. Početak

formiranja arome voća i povrća počinje kada nekoliko čimbenika okoliša, poput klime, tla, makro- i mikronutrijenata utječu na njihovu fotosintezu i pravilan razvoj karakteristične arome (Salunkhe, 2009).



Slika 5. Sinteza hlapljivih aromatičnih spojeva u voću i povrću

Masne kiseline

Glavni prekursori hlapljivih spojeva arome u većini voća su masne kiseline (Sanz i sur.,1997). Biosintetski put uključuje β -oksidaciju, hidroksikiselinsko cijepanje koje vodi do laktone, i lipoksigenazu koja tvori aldehide, ketone, kiseline, alkohole, laktone i estere iz lipida (Heath i Reineccius, 1986). U neoštećenom voću hlapljivi spojevi arome tvore se biosintetskim putem β -oksidacije, a u oštećenom tkivu voća hlapljivi spojevi tvore se putem lipoksigenaze (Schreier, 1984). Karakteristični okus i aroma jabuke se razvijaju tijekom zrenja, nakon berbe. Što su jabuke zrelije, to je sinteza lipida i propusnost membrana veća, isto kao i aktivnost lipoksigenaze u oštećenom tkivu zrelog voća.

β -oksidacija masnih kiselina je primarni biosintetski put koji osigurava alkohole i acil koenzim A (CoA) za sintezu estera (Sanz i sur.,1997). Masne kiseline acil-CoA derivata se prevode u kraće lance acil-CoA gubeći po dva ugljika u svakom krugu β -oksidacije, uz prisustvo flavin adenin dinukleotida (FAD), nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) i slobodni

CoA. Acil CoA reduktaza reducira acil CoA u aldehide, koji se zatim reduciraju u alkohol pomoću alkohol dehidrogenaze (ADH). Alkohol acil CoA transferaza (AAT) koristi alkohol za proizvodnju estera.

Kada je voće homogenizirano, linolna i linolenska kiselina su oksidirane u različite C6 i C9 aldehide. Ovi hlapljivi spojevi dosežu maksimalnu koncentraciju u prvih 10-30 min poslije homogenizacije. Takvi C6 aldehidi su odgovorni za 'zelene' mirisne note (Hatanaka,1993). U neoštećenom voću, enzimi biosintetskog puta lipoksigenaze i njihov supstrat imaju različite subcelularne lokacije, sprječavajući formiranje hlapljivih spojeva (Sanz i sur.,1997). Biosintetski put lipoksigenaze može osigurati supstrate za proizvodnju estera, npr. tretiranjem 'Golden Delicious' jabuka s heksanalom i parom heksanske kiseline, poveća se koncentracija heksila, butila i etil estera (De Pooter i sur.,1983). Da je put lipoksigenaze aktivan tijekom zrenja, predstavljao bi alternativu β -oksidaciji masnih kiselina.

Aminokiseline

Metabolizmom aminokiselina valina, leucina, izoleucina, alanina i asparaginske kiseline mogu se proizvesti alkoholi sa razgranatim lancem, esteri i karbonili (Heath i Reineccius, 1986; Sanz i sur.,1997). Različite koncentracije slobodnih aminokiselina uzrokuju različite koncentracije razgranatih lanaca hlapljivih spojeva u voću.

Za izoleucin se smatra da je biosintetski prekursor 2-metil butanske kiseline i njezinih estera u jabukama (Paillard, 1990). Deuterirani izoleucin se metabolizira u 2-metil butan-1-ol i u 2-metil butil i 2-metil-2-butenil ester u 'Red Delicious' jabukama, dok se etil-2-metil butanoat proizvodi gotovo isključivo u 'Granny Smith' jabukama (Rowan i sur.,1996). U 'Red Delicious', 'Fuji', 'Granny Smith' jabukama su različiti omjeri pretvorbe aminokiselina u hlapljive spojeve, posebice u metabolizmu leucina i izoleucina. To sugerira da različita enzimaska aktivnost i selektivnost, više nego dostupnost supstrata za put degradacije aminokiselina, određuju koncentraciju razgranatih lanaca estera za svaku sortu (Rowan i sur.,1997).

Aldehidi

Pretvorba aldehida do alkohola uključuje ADH koja katalizira oksidaciju alkohola i redukciju aldehida sa NAD i NADH kao kofaktore. Alkohol dehidrogenaza iz 'Cox's Orange Pippin' jabuka ima optimalnu aktivnost pri pH 5.5-6.0 kod redukcije acetaldehida i pH 7.0-10.0 kada oksidira etanol. Ima 13-puta veći afinitet za acetaldehid nego za etanol u jabukama

(Bartley i Hindley,1980). Iako je ADH u jabukama aktivniji na širokom rasponu aldehida, afinitet supstrata za spojeve duže od C2 ugljikove lance aldehida i alkohola je veći nego za ravne lance, nego za razgranate lance spojeva.

Esteri

Proizvodnja estera u voćnom tkivu je rezultat esterifikacije alkohola, karboksilne kiseline i acil-CoA u oksidativnim reakcijama (Drawert i Berger, 1983). Optimalna temperatura za maksimalnu aktivnost je 30 °C, pH raspon je 7-7.8, sulfidril grupe su neophodne za aktivnost. Aktivnost je povezana sa metabolizmom lipida. Jabuke izložene atmosferi koja sadrži alkohole niske molekulske mase, imaju povećanu koncentraciju estera s odgovarajućim alkoholnim dijelom (Berger 1995).

2.3.3. UTJECAJ MINERALNE PRIHRANE NA TVARI AROME

Iako su prijašnja istraživanja povezivala smanjenu primjenu dušikove fertilizacije sa slabom kvalitetom okusa jabuke (Fellman, Miller, Mattinson i Mattheis, 1964), novija istraživanja ukazuju da dušikova fertilizacija jabuka ima mali ili skoro nikakav utjecaj na sintezu aromatskih spojeva (Fellman, Miller, Mattinson i Mattheis, 2000). Razgranate aminokiseline su prekursori za sintezu razgranatih estera, koji su važni aromatski spojevi u jabuci. Folijarna primjena veće koncentracije dušika nije utjecala na prekursore aminokiselina, niti na samu sintezu aromatskih spojeva (Fellman i sur,2000).

Provedeno istraživanje na rizling vinima je pokazalo da koncentracija većina estera proporcionalno raste s količinom dušika, unesenog putem fertilizacije. Koncentracije etil heksanoata, etil oktanoata i etil dekanoata su se dvostruko povećale s povećanom količinom dušikove fertilizacije, dok se koncentracija dietil sukcinata smanjila se s povećanom koncentracijom dušika. Jedini ester na kojeg nije djelovao dušik je dodecil acetat (Edwards, 1993).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu rada korištena je sorta jabuke 'Disocovery' uzgojena u Norveškoj. Jabuke su uz normalnu gnojidbu bile dodatno folijarno prihranjivane kombinacijom dušika i kalcija. Doza kombinacije dušika i kalcija za jednu aplikaciju je iznosila 3 kg, odnosno 2,5 kg/ha tla. Po jedinici površine (ha=10 000 m²) je ukupno primijenjeno 18 kg dušika u obliku uree i 15 kg kalcija u obliku CaCl₂. Jabuke su ubrane 13. rujna 2012. godine te čuvane u normalnoj atmosferi pri 1°C na tri mjeseca. Prvi dio analize proveden je prije, dok drugi po završetku skladištenja.

3.2 METODE RADA

3.2.1. PRIPREMA UZORAKA

Pokožica i mesnati dio ploda su usitnjeni i pohranjeni u metafosfornu kiselinu (MPA) u epruветama za centrifugu volumena 50 ml. U epruветama je bilo 10 g usitnjenog uzorka jabuke i 10 g metafosforne kiseline (MPA). Tijekom transporta uzorci su bili pohranjeni u suhom ledu, zatim skladištenu u hladnjači na -20°C. Uzorci su prije analize još dodatno bili usitnjeni ultraturskom (Ultra-Turrax T25, Njemačka).

Na uzorcima jabuke je određivan sastav aromatskih spojeva.

3.2.2. ODREĐIVANJE HLAPLJIVIH SPOJEVA HS-SPME/GC-MS METODOM

Princip određivanja

HS-SPME (Headspace solid-phase microextraction), tj. mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi je jednostavna i brza metoda za izolaciju hlapljivih i nehlapljivih spojeva, koja ne koristi otapalo. Metoda kombinira ekstrakciju, koncentriranje i direktan prijenos apsorbiranih

spojeva do injektora plinskog kromatografa (Bart, 2006). Uzorak s hlapljivim spojevima stavi se u staklenu bočicu, te se zatvori s odgovarajućim čepom sa septumom. SPME igla se uvodi kroz septum, a vlakno prolazi kroz iglu. Vlakno je izloženo fazi pare koja se nalazi iznad tekućeg uzorka. Preko vlakna se vrši ekstrakcija. Nakon određenog vremena ekstrakcije, vlakno se povuče u iglu, te se igla ukloni iz bočice i direktno uključi u injektor plinskog kromatografa. Desorpcija spojeva iz ovojnice vlakna se provodi zagrijavanjem vlakna u injektoru plinskog kromatografa.

HS-SPME tehnika u kombinaciji sa plinskom kromatografijom uz masenu detekciju (GC-MS) ili plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) su prikladni za ekstrakciju hlapljivih spojeva u tekućim uzorcima. Plinski kromatograf (GC) se koristi za separaciju komponenti, a maseni spektrometar (MS) za detekciju i identifikaciju spojeva. Maseni spektrometar injektirani materijal ionizira u visokom vakuumu, pokreće i usmjerava ione prema detektoru, koji skuplja i mjeri količine svakog prikupljenog iona (McMaster, 2008).

Aparatura i pribor

1. Filter papir
2. Lijevak za filtriranje
3. Epruvete za centrifugu – volumena 25 ml
4. Pipete – volumena 1-100 μ L, 1-5 mL
5. Staklene bočice
6. Odmjerne tikvice – volumena 50 mL
7. Analitička vaga – Mettler Toledo, Švicarska
8. Vorteks – Mini Vortex (SAD)
9. HS-SPME/ GC-MS

Reagensi

1. Etil heptanoat (interni standard)
2. Destilirana voda

Priprema uzorka

Za pripremu internog standarda koristi se 4.9 mg etil heptanoata i 50 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici. Uzorci jabuke se filtriraju preko filter papira u epruvete za centrifugiranje. Otpipetira se 5 mL filtrata i 5 μ L internog standarda etil heptanoata u staklenu bočicu.

Postupak određivanja plinskom kromatografijom

Ekstrakcija hlapljivih spojeva se izvodi pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (SPME, Stable Flex, Supelco), vlakna su obložena sa Carboxen/polidimetilsiloksan sorbensom (1 cm, 85 μ m debljine, Supelco, Bellefonte, PA). Analiza je provedena na GC 7890A plinskom kromatografu (Agilent Technologies, CA, SAD) opremljenim sa MPS2 višenamjenskim autosamlerom (Gerstel GmbH, Mülheim an der Ruhr, Njemačka) i 5975C masenim spektrometrom (Agilent Technologies). Uzorci bočice su postavljeni u toplinskom modulu kontrolirane temperature pri 40°C na 30 minuta. Hlapljivi spojevi se desorbiraju u GC injektor na 250°C na nerascijepan način na 2 minute. Plinski kromatograf je opremljen sa ZB-WAX kapilarnom kolonom, 60 m x 0.32 mm ID sa 1 μ m debljinom filma. Helij je plin nosač pri brzini protoka od 1.2 mL/min na 40°C. Temperatura peći je bila programirana na slijedeći način: početna temperatura od 40°C zadržana je na 5 min, a zatim 4°C/min do 230°C. Hlapljivi spojevi su identificirani sa selektivnim masenim detektorom (5975C, Agilent Technologies, CA, USA). Detektor je djelovao u m/z rasponu između 30 i 250, izvor iona i kvadrupolna temperatura su održavani pojedinačno na 250 i 150°C. Identifikacija spojeva provedena je usporedbom masenih spektara s onim dostupnim komercijalnim standardima, sve spojeve je potvrdilo podudaranje masenih spektara sa NIST 2.0 masenih spektralnih podataka (National Institute of Standards and Technology, USA).

Izračunavanje

Pomoću internog standarda pripremljena je otopina standarda od koje su napravljena razrjeđenja, te su dalje propušтана kroz plinski kromatograf. U programu Excell od dobivenih rezultata nacrtan je baždarni pravac na kojem se na ordinati nalazi površina pika, a na apscisi koncentracija standarda, te su pomoću njegove jednadžbe izračunate koncentracije pojedinih aromatskih spojeva u uzorku uzevši nadalje u obzir masu i razrijeđenje. Koncentracije su izražene u μ g/L.

4. REZULTATI

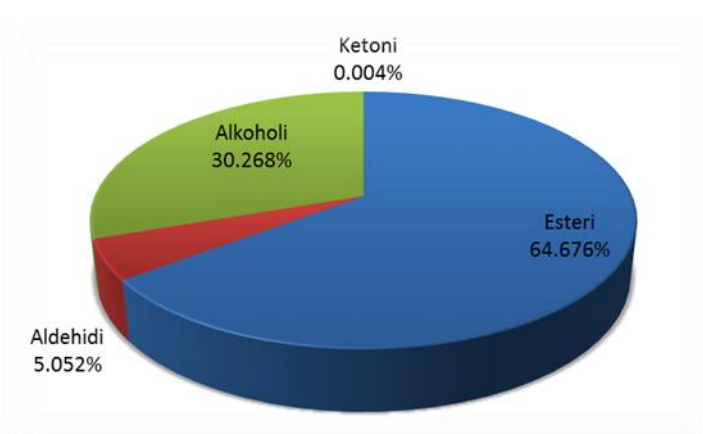
U radu je provedena analiza aromatskog sastava jabuka prije i nakon skladištenja. Istraživao se utjecaj kombiniranog djelovanja kalcijeve i dušikove folijarne prihrane, te utjecaj skladištenja na sintezu aromatskih spojeva. Rezultati i identificirani aromatski spojevi su prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Naziv i koncentracija aromatskih spojeva ($\mu\text{g/L}$) identificiranih u netretiranim i tretiranim 'Discovery' jabukama prije i nakon skladištenja

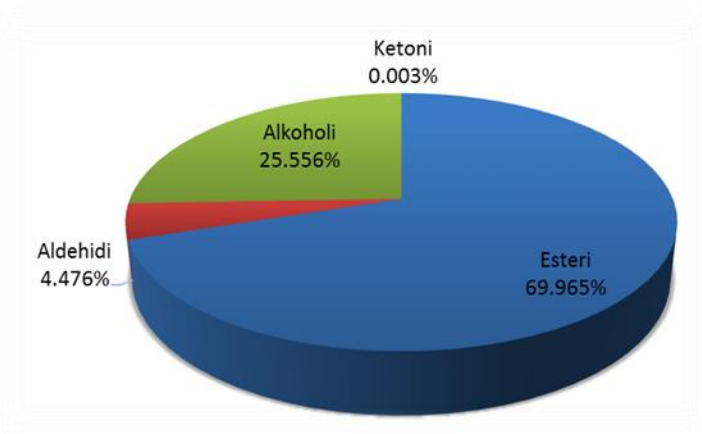
Br.	Aromatski spoj	Prije skladištenja		Nakon skladištenja	
		Netretirane jabuke	Tretirane jabuke (Ca+N)	Netretirane jabuke	Tretirane jabuke (Ca+N)
	Esteri				
1	Metil butanoat	- ± -	- ± -	0,210 ± 0,026	0,340 ± 0,217
2	Izobutil acetat	4,520 ± 0,586	3,210 ± 0,591	3,327 ± 0,284	1,880 ± 0,236
3	Etil butanoat	1,383 ± 0,248	2,243 ± 0,231	1,803 ± 0,328	1,357 ± 0,326
4	Etil 2-metilbutanoat	0,147 ± 0,035	0,163 ± 0,025	0,160 ± 0,044	0,100 ± 0,026
5	Butil acetat	319,733 ± 48,837	274,577 ± 50,283	223,767 ± 14,188	149,130 ± 23,529
6	2-metil butil acetat	61,080 ± 6,533	37,473 ± 7,796	16,033 ± 3,300	8,317 ± 2,135
7	Pentil acetat	2,277 ± 0,318	1,797 ± 0,367	1,127 ± 0,105	0,650 ± 0,210
8	Butil butanoat	0,603 ± 0,116	0,417 ± 0,122	0,707 ± 0,235	0,310 ± 0,095
9	Heksil acetat	16,243 ± 2,952	13,047 ± 3,103	6,797 ± 1,204	3,700 ± 1,301
10	Heksil heksanoat	0,563 ± 0,136	0,457 ± 0,070	2,353 ± 0,648	1,747 ± 0,387
	Aldehidi				
11	Heksanal	6,890 ± 0,131	7,600 ± 1,499	3,283 ± 1,322	3,047 ± 0,365
12	2-heksanal	19,117 ± 0,220	18,440 ± 3,970	10,303 ± 3,575	11,570 ± 3,808
	Alkoholi				
13	1-butanol	115,407 ± 6,378	124,780 ± 14,040	151,153 ± 1,741	166,543 ± 1,085
14	Heksanol	33,093 ± 3,883	31,240 ± 4,034	29,953 ± 5,061	35,563 ± 11,012
	Ketoni				
15	6-metil-5-hepten-2-ona	0,020 ± 0,000	0,020 ± 0,000	0,117 ± 0,035	0,087 ± 0,023

* navedeni rezultati u tablici prikazani su kao srednja vrijednost koncentracija tri uzorka ± standardna devijacija

Slike 6, 7, 8 i 9 prikazuju udjele pojedinih kemijskih skupina u ukupnoj količini identificiranih spojeva ovisno nalaze li se u jabukama tretiranim kalcijem i dušikom ili netretiranim, odnosno uzorcima analiziranim prije ili poslije skladištenja.



Slika 6. Udio pojedinih kemijskih skupina u tretiranim jabukama prije skladištenja



Slika 7. Udio pojedinih kemijskih skupina u netretiranim jabukama prije skladištenja



Slika 8. Udio pojedinih kemijskih skupina u tretiranim jabukama nakon skladištenja



Slika 9. Udio pojedinih kemijskih skupina u netretiranim jabukama nakon skladištenja



Slika 10. Prikaz koncentracija i standardnih devijacija najvažnijih i najzastupljenijih aromatskih spojeva u uzorcima jabuka 'Discovery'

5. RASPRAVA

Kod 4 analizirana uzorka jabuke pronađeno je i identificirano 15 hlapljivih spojeva arome, koji su svrstani u odgovarajuće kemijske grupe (tablica 2). Najbrojniji spojevi su esteri s 10 spojeva, zatim slijede aldehidi i alkoholi s 2 spoja, te ketoni s jednim spojem. Iz skupine estera sintetizirani su metil butanoat, izobutil acetat, etil butanoat, etil 2-metilbutanoat, butil acetat, 2-metil butil acetat, pentil acetat, butil butanoat, heksil acetat, heksil heksanoat, iz skupine aldehida sintetizirani su heksanal i 2-heksanal, iz skupine alkohola 1-butanol i heksanol, te od ketona sintetiziran je 6-metil-5-hepten-2-ona.

Prema rezultatima iz tablice 2 može se zaključiti da jabuke tretirane kombinacijom kalcija i dušika, analizirane prije skladištenja sadrže manje koncentracije estera za razliku od netretiranih jabuka. Etil butanoat je jedini ester na čiju sintezu povoljno djeluje kalcij i dušik. Kalcij i dušik nisu imali utjecaja na koncentraciju ketona, dok je koncentracija alkohola 1-butanola i aldehida heksanala porasla u tretiranim jabukama.

Analiza provedena nakon čuvanja jabuka u normalnoj atmosferi je pokazala da tretirane jabuke i dalje pokazuju nižu koncentraciju estera u odnosu na netretirane. Ester metil butanoat je jedini spoj koji se sintetizirao tokom čuvanja jabuke, te je pokazao veću koncentraciju u tretiranim jabukama. Koncentracije alkohola su tijekom čuvanja povećale kod tretiranih jabuka, posebice koncentracije 1-butanola.

Prema rezultatima, na koncentraciju 1-butanola pozitivno utječe tretiranje kalcijem i dušikom, te skladištenje. Tretirane jabuke su u oba slučaja pokazale veće koncentracije nego netretirane. Na slikama 6, 7, 8, 9 vidi se je koncentracija estera najveća u svim uzorcima jabuka, s obzirom na to može se reći da 'Discovery' jabuke pripadaju ester tipu jabuka. Koncentracije estera butil acetata, 2-metil butil acetata i heksil acetata, važnih hlapljivih spojeva koji najviše doprinose aromatskom učinku, su također manje u tretiranim jabukama prije i nakon čuvanja u normalnoj atmosferi.

Hlapljivi spojevi koji uzrokuju neugodnu aromu, poput acetaldehida, trans-2-heksanala, butil propionata, 3-metilbutil butirata i butil 3-metilbutirata nisu se sintetizirali u 'Discovery' jabukama.

Prema autoru Visaiu prisutnost butanola i heksanola je povezana sa slatkoćom, a s obzirom da se koncentracija 1-butanola povećava sa skladištenjem i tretiranjem, može se reći da je sorta

'Discovery' spada u slatke jabuke. Etil 2-metilbutirat doprinosi voćnom okusu, a heksil acetat sa slatkim-voćnim mirisom.

6. ZAKLJUČAK

SPME-GC-MS analizom 'Discovery' jabuka određeni su aromatski spojevi iz kojih se može zaključiti sljedeće:

1. Ukupno je identificirano 15 hlapljivih spojeva. Od kojih je deset estera, dva aldehida, dva alkohola i jedan keton. Identificirani esteri su metil butanoat, izobutil acetat, etil butanoat, etil 2-metilbutanoat, butil acetat, 2-metil butil acetat, pentil acetat, butil butanoat, heksil acetat, heksil heksanoat, aldehidi heksanal i 2-heksanal, alkoholi 1-butanol i heksanol, te keton 6-metil-5-hepten-2-ona.
2. Koncentracije svih estera su bile veće u netretiranim nego u tretiranim jabukama, osim etil butanoata i etil 2-metilbutanoata, dok su nakon skladištenja i njihove koncentracije bile manje kod tretiranih.
3. Kalcijeva i dušikova primjena je pozitivno djelovala na sintezu 1-butanola, čija je koncentracija prije i nakon skladištenja i dalje bila veća kod tretiranih nego kod netretiranih jabuka.
4. Koncentracija heksanola se povećala jedino u uzorcima nakon skladištenja tretiranih jabuka.
5. Općenito primjena kalcijeve i dušikove prihrane negativno utječe na sintezu estera, a pozitivno na sintezu alkohola.
6. Skladištenjem uzoraka koncentracije estera i aldehida su se smanjile, dok su se koncentracije alkohola i ketona povećale. Tijekom skladištenja sintetizirao se novi spoj, metil butanoat.

7. LITERATURA

1. Anonymous 1. <https://en.wikipedia.org/wiki/Malus_sieversii>. Pristupljeno 13. kolovoza 2015.
2. Anonymous 2. <<http://www.orangepippin.com/apples/discovery>>. Pristupljeno 29. srpnja 2015.
3. Anonymous 3. <<https://fruitforum.wordpress.com/2008/09/14/are-pink-fleshed-apples-good-for-you/>>. Pristupljeno 6. kolovoza 2015.
4. Anonymous 4. <http://www.academia.edu/7186471/Aroma_1>. Pristupljeno 17. kolovoza 2015.
5. Anonymous (2015) Discovery apple, <<http://www.orangepippin.com/>>. Pristupljeno 28. srpnja 2015.
6. Ahmad, N. (1996) Nitrogen economy in tropical soils, 1.izd., Kluwer Academic Publishers, Nizozemska.
7. Barber, S.A. (1995) Soil nutrient bioavailability: A mechanistic Approach, 2.izd., John Wiley & Sons, Inc., New York.
8. Dixon, J., Hewett E.W. (2010) Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: A Review. *New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science*, **28:3**, 155-173.
9. Dunemann, F., Ulrich, D., Malysheva-Otto, L., Weber, W.E., Longhi, S., Velasco, R., Costa, F. (2011) Functional allelic diversity of the apple alcohol acyl-transferase gene MdAAT1 associated with fruit ester volatile contents in apple cultivars. *Mol Breeding*, **29**, 606-625.
10. DZS (2006) Državni zavod za statistiku.< <http://www.dzs.hr/>>. Pristupljeno 10. kolovoza 2015.
11. El Hadi, M.A.M, Zhang, F.J., Wu, F.F., Zhou, C.H., Tao, J. (2013) Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules*, **18**, 8200-8229.
12. Fageria, N.K., Baligar, V.C., Jones, C.A. (2010) Growth and mineral nutrition of field crops, 3.izd., CRC Press Taylor & Francis Group.
13. Hancock, J.F. (2008) Temperate fruit crop breeding: Germplasm to genomics, Springer Science + Business Media B. V.
14. Hui, Y.H. (2007) Handbook of food products manufacturing, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

15. López, M.L., Lavilla, M.T., Riba, M., Vendrell, M. (1997) Comparison of volatile compounds in two seasons in apples: Golden Delicious and Granny Smith. *J Food Quality*, **21**, 155-166.
16. Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants, 2.izd., Academic Press, London.
17. Mengel, K., Kirkby, E.A. (2001) Principles of plant nutrition, 5.izd., Kluwer Academic Publishers, Nizozemska.
18. Salunkhe, D.K., Do, J.Y., Maga, J.A. (2009) Biogenesis of aroma constituents of fruits and vegetables. *CRC Crit Rev Food Sci*, **8:2**, 161-190.
19. Šoškić, M.M. (2008) Savremeno voćarstvo, 2. izd., Partenon, Beograd.
20. USDA (2012) United States Department of Agriculture.
<<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/index>> Pristupljeno 10. kolovoza 2015.
21. WAPA (2001) The World Apple and Pear Association. <http://www.wapa-association.org/asp/index.asp>. Pristupljeno 8. kolovoza 2015.
22. Young, H., Gilbert, J.M., Murray, S.H., Ball, R.D. (1996) Causal effect of aroma compound on Royal Gala apple flavours. *J Sci Food Agric*, **71**, 329-336.
23. Young, H., Gilbert, J.M., Murray, S.H., Ball, R.D. (1996) Causal effect of aroma compound on Royal Gala apple flavours. *J Sci Food Agric*, **71**, 329-336.